

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET**  
**BIOLOŠKI ODSJEK**

**MULTIFUNKCIONALNA SVOJSTVA BILJNIH PROTEINA:  
CITOPLAZMATSKA GLICERALDEHID-3-FOSFAT  
DEHIDROGENAZA KAO *MOONLIGHTING* PROTEIN**

**MULTIFUNCTIONAL PROPERTIES OF PLANT PROTEINS:  
CYTOPLASMIC GLYCERALDEHYDE-3-PHOSPHATE  
DEHYDROGENASE AS A MOONLIGHTING PROTEIN**

**SEMINARSKI RAD**

Sanja Srakočić

Preddiplomski studij molekularne biologije  
(Undergraduate Study of Molecular Biology)

Mentor: izv. prof. dr. sc. Biljana Balen

Zagreb, 2016.

## SADRŽAJ

1	UVOD .....	3
2	STRUKTURA I REAKCIJSKI MEHANIZAM GAPDH.....	4
2.1	Regije GAPDH sa očuvanim aminokiselinskim sekvencama.....	4
2.2	Reakcijski mehanizam biljne citoplazmatske GAPDH.....	4
2.3	Trodimenzijska struktura biljne citoplazmatske GAPDH.....	7
3	POSTTRANSLACIJSKE REDOKS MODIFIKACIJE BILJNE CITOPLAZMATSKE GAPDH.....	7
3.1	S-nitrozilacija.....	7
3.2	Oksidacijske modifikacije.....	8
3.3	Glutacionilacija .....	8
4	MOONLIGHTING FUNKCIJE ANIMALNE GAPDH.....	9
4.1	Uloga animalne GAPDH u apoptozi .....	9
4.2	Posttranskripcijska regulacija ekspresije gena posredovana animalnom GAPDH.....	10
5	METABOLIČKE I MOONLIGHTING FUNKCIJE BILJNE CITOPLAZMATSKE GAPDH.....	10
5.1	Metaboličke funkcije .....	10
5.2	Moonlighting funkcije .....	10
5.2.1	Prijenos signala posredovan biljnom citoplazmatskom GAPDH .....	11
5.2.2	Lokalizacija biljne citoplazmatske GAPDH u jezgri.....	12
5.2.3	Vezanje biljne citoplazmatske GAPDH na membranu mitohondrija i na citoskelet.....	14
5.2.4	Uloga citoplazmatske GAPDH u imunološkom odgovoru biljke.....	14
6	ZAKLJUČAK .....	16
7	LITERATURA .....	17
8	SAŽETAK .....	19
9	SUMMARY .....	20

## 1 UVOD

Gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza (GAPDH) je enzim koji katalizira pretvorbu gliceraldehid-3-fosfata (G3P) u 1,3-bisfosfoglicerat (BPGA) uz prisutnost nikotinamid adenin dinukleotida ( $\text{NAD}^+$ ) i anorganskog fosfata. Ona je jedan od enzima glikolize i nalazimo je u gotovo svim živim organizmima. Biljke imaju nekoliko izoenzima GAPDH koji su kodirani različitim genima i nalaze se u različitim staničnim odjeljcima (Zaffagini i sur. 2013). Geni *gapA* i *gapB* kodiraju za izoenzime  $\text{A}_2\text{B}_2$  i  $\text{A}_4$ -GAPDH koji su lokalizirani u kloroplastu. Geni *gapC* i *gapCp* kodiraju za podjedinice citoplazmatske GAPDH koja može biti lokalizirana u citoplazmi ili u plastidima. Osim metaboličke uloge, gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza ima još neke dodatne funkcije i svrstava se u skupinu *moonlighting* proteina.

*Moonlighting* proteini su najprije otkriveni u animalnim stanicama. To su proteini koji uz originalne, obavljaju i dodatne funkcije. Vrlo često su originalne i dodatne funkcije potpuno nepovezane. U animalnim stanicama GAPDH uz ulogu u glikolizi ima funkciju u kontroli ekspresije gena i apoptozi. Utvrđeno je da su posttranslacijske modifikacije neophodne za *moonlighting* funkcije animalne GAPDH (Sirover 2014). Redoks modifikacije u katalitičkom mjestu inaktiviraju enzimsku aktivnost, ali isto tako mogu uzrokovati i promjene u substaničnoj lokalizaciji. *Moonlighting* funkcije animalne GAPDH su dobro poznate, dok se vrlo malo zna o *moonlighting* funkcijama biljne citoplazmatske GAPDH. U biljnim stanicama dolazi do redoks modifikacija citoplazmatske GAPDH, koje najvjerojatnije uzrokuju promjene u substaničnoj lokalizaciji (Zaffagini i sur. 2013). Dokazano je da biljna citoplazmatska GAPDH stupa u interakciju sa mnogim proteinima, ali za sada se ne zna koje su funkcije tih interakcija. Brojna istraživanja upućuju na prisutnost dodatnih funkcija biljne citoplazmatske GAPDH te se zato smatra da je i ona *moonlighting* protein.

Cilj ovog rada je napraviti kratki osvrt na dosadašnja istraživanja koja upućuju na moguće *moonlighting* funkcije biljne citoplazmatske GAPDH. Radi boljeg razumijevanja *moonlighting* funkcija najprije treba objasniti strukturu i reakcijski mehanizam enzima te posttranslacijske redoks modifikacije. Poznavanje *moonlighting* funkcija animalne GAPDH nam omogućava bolje razumijevanje uloga posttranslacijskih modifikacija te nam može pomoći u istraživanju *moonlighting* funkcija biljne citoplazmatske GAPDH.

## 2 STRUKTURA I REAKCIJSKI MEHANIZAM GAPDH

U svim organizmima glavna uloga GAPDH je u procesu glikolize, a filogenetičkom analizom je dokazano da GAPDH ima vrlo očuvanu aminokiselinsku sekvencu i isti reakcijski mehanizam.

### 2.1 Regije GAPDH sa očuvanim aminokiselinskim sekvencama

U aminokiselinskoj sekvenci GAPDH posebno se ističu dvije regije čija je sekvenca ista u svim organizmima. Prva očuvana regija se nalazi na N-terminalnom dijelu i sastoji se od slijeda amino kiselina NGFGRIGR (od Asn-9 do Arg-16). Ta sekvenca sudjeluje u vezanju kofaktora  $\text{NAD}^+$ . Pirofosfatna okosnica kofaktora  $\text{NAD}^+$  stvara vodikove veze sa NGFGRIGR regijom, direktno ili preko molekula vode, te se tako veže na GAPDH. Karboksilna skupina Asp-35 stvara dvije vodikove veze sa hidroksilnim skupinama na 2' i 3' C-atomima riboze na koju je vezan adenin u molekuli  $\text{NAD}^+$ . Regija NGFGRIGR i bočni ogranci Asp-35, Phe-37 i Asp-191 stabiliziraju kofaktor  $\text{NAD}^+$  (Zaffagnini i sur. 2013).

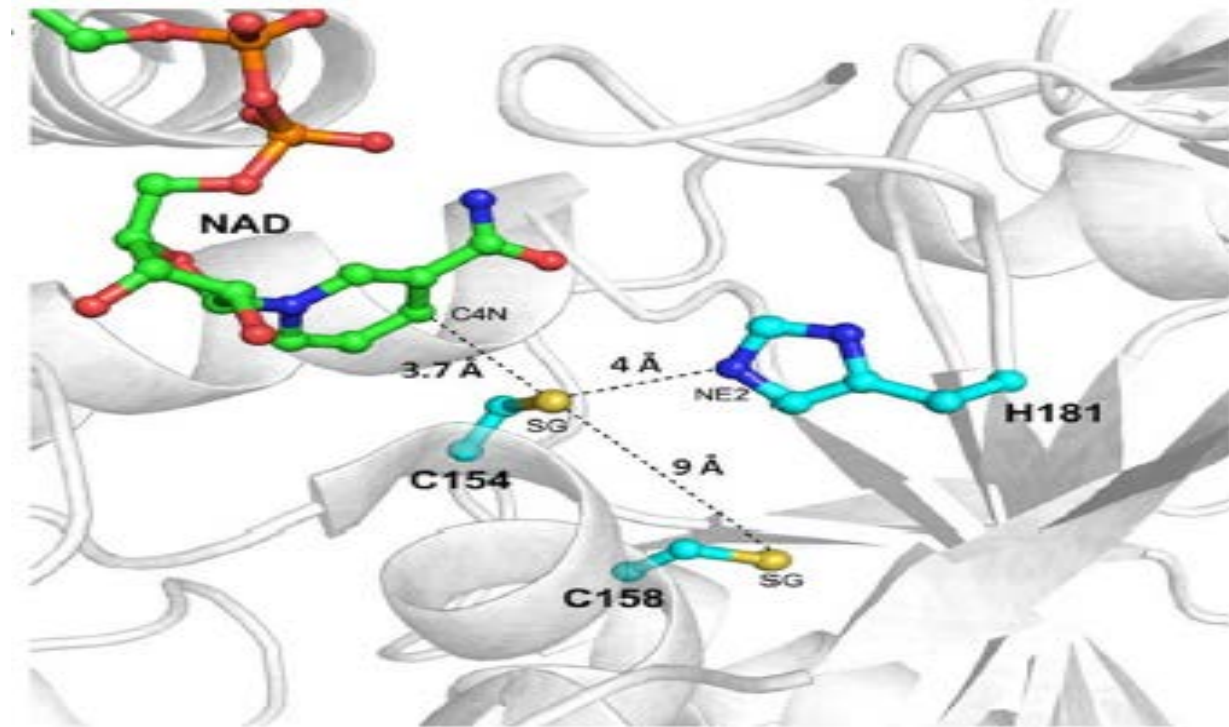
Druga očuvana regija se nalazi otprilike na sredini aminokiselinske sekvence i predstavlja katalitičko mjesto enzima. U toj regiji su očuvane pojedine aminokiseline koje sudjeluju u vezanju supstrata i katalizi. Posebno su očuvani katalitički Cys-154 i Cys-158, koji ne sudjeluje u katalizi, te His-181 koji je važan za aktivaciju Cys-154 (Zaffagnini i sur. 2013).

### 2.2 Reakcijski mehanizam biljne citoplazmatske GAPDH

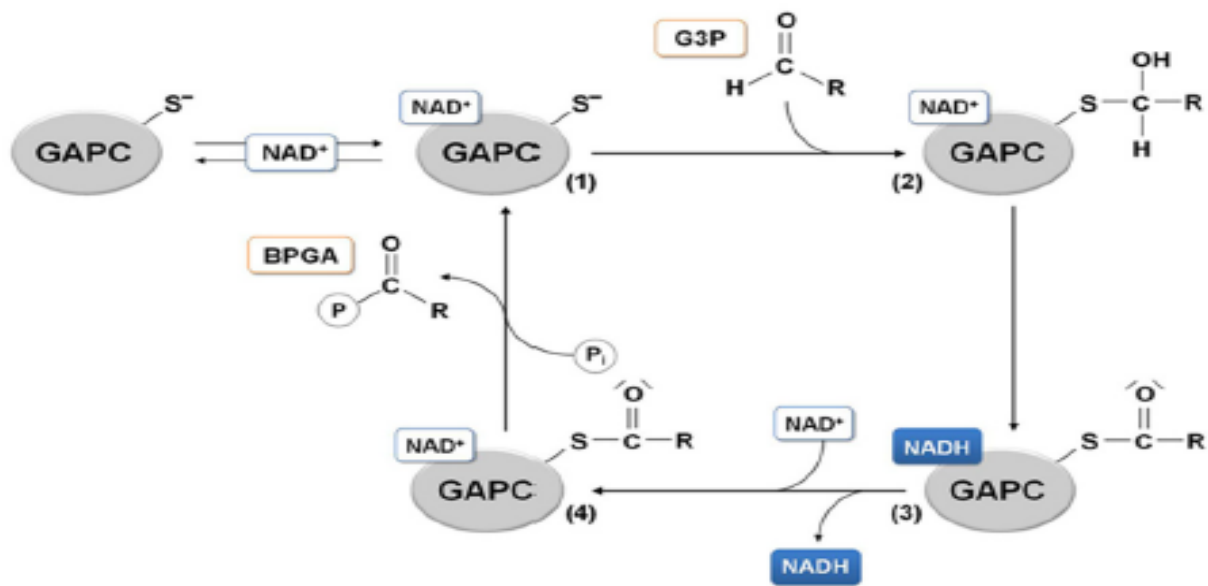
Bočni ogranak Cys-154 je okrenut prema bočnom ogranku His-181 i udaljenost između njih je 4,03 Å (Slika 1.). Udaljenost Cys-154 od  $\text{NAD}^+$  je 3,69 Å. U blizini katalitičkog cisteina se nalazi još jedan cistein (Cys-158) koji je smješten u istoj  $\alpha$  zavojnici kao i Cys-154. Na kristalnoj strukturi (Slika 1.) se vidi da su ta dva cisteina orijentirana u suprotnim smjerovima. Udaljenost među njima iznosi 9 Å i između njih ne može doći do formiranja disulfidne veze (Zaffagnini i sur. 2013).

Kada se ogranak bazične amino kiseline nalazi blizu (na udaljenosti manjoj od 6 Å) bočnog ogranka Cys dolazi do deprotonacije tiola (-SH) u nukleofilni tiolat ( $-\text{S}^-$ ). Iz ovog proizlazi model prema kojem je His-181 odgovoran za kiselinsko-bazičnu katalizu (Zaffagnini i sur. 2013). Uzima proton ( $\text{H}^+$ ) od Cys-154, čime se omogućava nukleofilni napad tiolata na supstrat (Slika 2.). Tiolat reagira s karbonilnom skupinom supstrata (G3P) i nastane hemitioacetal kao

intermedijer. Zatim dolazi do oksidacije, vodik sa intermedijera se prenosi na kofaktor  $\text{NAD}^+$  koji se reducira u NADH. Nastane novi acil-enzim intermedijer. U sljedećem koraku se anorganski fosfat reagira sa acil-enzim intermedijerom i otpušta se produkt (BPGA).



**Slika 1.:** Kristalna struktura katalitičkog mjesta citoplazmatske GAPDH iz riže (*Oryza sativa*) sa vezanim kofaktorom  $\text{NAD}^+$ . Bojom su posebno istaknuti bočni ogranci Cys-154 i His-181 koji su bitni za katalizu te bočni ogranak Cys-158. (preuzeto iz Zaffagnini i sur. 2013)



**Slika 2.:** Shematski prikaz reakcijskog mehanizma biljne citoplazmatske GAPDH (GAPC). 1) Supstrat (G3P) se veže u aktivno mjesto enzima, ali samo ako je kofaktor  $\text{NAD}^+$  prisutan. 2) Deprotonirani bočni ogranak Cys-154 nukleofilno napada karbonilnu skupinu G3P i nastaje hemitioacetalni intermedijer. 3) Dolazi do oksidacije,  $\text{H}^+$  sa intermedijera se prenosi na  $\text{NAD}^+$  koji se reducira u NADH i otpušta sa enzima. Nastane novi acil-enzim intermedijer. 4)  $\text{NAD}^+$  se veže u svoje mjesto na GAPDH. Anorganski fosfat reagira sa acil-enzim intermedijerom i otpušta se produkt (BPGA). (preuzeto iz Zaffagnini i sur. 2013)

Kako bi se procijenila reaktivnost katalitičkog Cys-154 u fiziološkim uvjetima mora se odrediti njegova  $\text{pK}_a$ , tj. najmanja vrijednost pH pri kojoj dolazi do deprotonacije bočnog ogranka. Ako je pH vrijednost u stanici manja od  $\text{pK}_a$  onda je bočni ogranak Cys-154 protoniran i enzim ne može obavljati katalitičku aktivnost. Eksperimentalno određena  $\text{pK}_a$  vrijednost Cys-154 iznosi 5,65 (Bedhomme i sur. 2012), što znači da je pri fiziološkom pH bočni ogranak Cys-154 deprotoniran i enzim može katalizirati reakciju. Eksperimentalno utvrđena  $\text{pK}_a$  vrijednost His-181 iznosi 8,0 (Zaffagnini i sur. 2013). U fiziološkim uvjetima bočni ogranak Cys-154 je deprotoniran i stvara ionski par sa protoniranim ogramkom His-181.

### 2.3 Trodimenzionalna struktura biljne citoplazmatske GAPDH

Od svih fotosintetskih organizama poznata je jedino kristalna struktura citoplazmatske GAPDH iz riže (*Oryza sativa*). Citoplazmatska GAPDH je homotetramer i ima tri osi simetrije. Između monomernih podjedinica nastaju vodikove veze koje stabiliziraju homotetramer. Svaka monomerna podjedinica se sastoji od dvije domene: domene za vezanje kofaktora i katalitičke domene. Domena za vezanje kofaktora se sastoji od šest paralelnih i dvije antiparalelne  $\beta$  ploče koje su okružene sa pet  $\alpha$  uzvojnica. Sve te strukture su povezane u Rossmannov motiv koji je karakterističan za proteine koji koriste NAD i FAD kao kofaktore (Rao i Rossmann 1972). Uz Rossmannov motiv domena za vezanje kofaktora sadrži i još jednu dugu  $\alpha$  uzvojnica koja odgovara C-terminalnom dijelu monomera. Katalitička domena se sastoji od tri  $\alpha$  uzvojnice, osam  $\beta$  ploča i S-petlje. S-petlja je dosta duga i proteže se do domene za vezanje kofaktora susjednog monomera u homotetrameru (Zaffagnini i sur. 2013).

## 3 POSTTRANSLACIJSKE REDOKS MODIFIKACIJE BILJNE CITOPLAZMATSKE GAPDH

Redoks modifikacije proteina su uglavnom uzrokovane kisikovim (ROS) ili dušikovim (RNS) radikalima. Reverzibilne redoks modifikacije imaju ulogu u signalizaciji, no nekontrolirana proizvodnja ROS i RNS može dovesti do oksidacijskog stresa i uzrokovati oštećenja proteina. Citoplazmatska GAPDH je podložna posttranslacijskim redoks promjenama zbog cisteina u katalitičkom mjestu. Deprotonirani cistein je jaki nukleofil i zato može reagirati sa mnogo različitih vrsta radikala. Fiziološki najznačajnije promjene su stvaranje inter ili intramolekulske disulfidne veze, glutathionilacija, S-nitrozilacija i oksidacija u sulfeničnu (-SOH), sulfiničnu (-SO<sub>2</sub>H) i sulfoničnu (-SO<sub>3</sub>H) kiselinu. Nakon redoks posttranslacijskih promjena u katalitičkom mjestu dolazi do inhibicije enzimske aktivnosti citoplazmatske GAPDH (Zaffagnini i sur. 2013).

### 3.1 S-nitrozilacija

S-nitrozilacijom proteina dolazi do formiranja nitrozotiola (-S-NO). Bočni ogranak cisteina reagira sa RNS (najčešće sa NO) ili dolazi do trans-nitrozilacije koja je posredovana s nitrozoglutationom (GSNO) ili drugim S-nitroziliranim proteinima. S-nitrozilacija biljne

citoplazmatke GAPDH inhibira njenu enzimsku aktivnost zato jer dolazi do modifikacije katalitičkog Cys-154. Ovaj proces je reverzibilan te se nakon tretmana enzima sa ditioneitolom (DTT) ponovno uspostavlja enzimska aktivnost (Zaffagnini i sur. 2013). Uočeno je da je S-nitrozilacija pomoću GSNO smanjena u prisutnosti kofaktora  $\text{NAD}^+$ . Vezanje kofaktora onemogućuje ulazak GSNO u katalitičko mjesto i tako se sprječava modifikacija Cys-154 (Bedhomme i sur. 2012).

### 3.2 Oksidacijske modifikacije

Vodikov peroksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) i ostali kisikovi radikali uzrokuju oksidaciju bočnog ogranka cisteina. Primarna oksidacija je reverzibilna, nastane sulfenična kiselina (-SOH) koja je jako nestabilna i podložna daljnjim oksidacijama. Daljnje oksidacije su ireverzibilne te nastaju sulfonična (- $\text{SO}_2\text{H}$ ) i sulfonična (- $\text{SO}_3\text{H}$ ) kiselina. Oksidacijske modifikacije inaktiviraju enzimsku aktivnost GAPDH. Nakon ireverzibilne oksidacije enzimsku aktivnost GAPDH se ne može vratiti niti nakon inkubacije enzima sa DTT. Supstrati enzima (gliceraldehid-3-fosfat i 1,3-bisfosfoglicerat u povratnoj reakciji) stvaraju kovalentne veze sa cisteinom u katalitičkom mjestu te tako štite GAPDH od oksidacije. Kofaktor  $\text{NAD}^+$  ne može zaštititi enzim od oksidacije. Kada se  $\text{NAD}^+$  veže, on može spriječiti reakciju Cys-154 sa velikim molekulama kao što je glutation i GSNO, ali male molekule (npr.  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) i kisikovi radikali svejedno mogu reagirati sa Cys-154 (Bedhomme i sur. 2012).

### 3.3 Glutationilacija

Glutationilacija je još jedna posttranslacijska modifikacija koja nastaje kada se formira disulfidni most između bočnog ogranka cisteina i glutathiona (GSH). Glutationilirani proteini se mogu reducirati pomoću enzima glutaredoksina i tioredoksina. Glutationilacija proteina se odvija u uvjetima oksidacijskog stresa i služi kao mehanizam zaštite proteina od ireverzibilne oksidacije, ali može imati ulogu i u regulaciji funkcije proteina. Nakon inkubacije GAPDH sa  $\text{H}_2\text{O}_2$  i glutathionom pokazalo se da dolazi do inhibicije enzimске aktivnosti, ali se ona vratila nakon tretmana s DTT-om. Glutathion se veže na bočni ogranak cisteina kada je on u sulfenatnom obliku te tako štiti GAPDH od daljnje, ireverzibilne oksidacije (Bedhomme i sur. 2012). Reakcija glutathiona sa GAPDH nije značajna u uvjetima *in vivo* jer zahtjeva visok omjer GSH/GSSG (reducirani oblik glutathiona/oksidirani oblik glutathiona), koji nije prisutan u fiziološkim uvjetima. Glutationilacija GAPDH se odvija jedino u uvjetima oksidacijskog stresa i



služi kao mehanizam zaštite enzima od ireverzibilne oksidacije ili kao mehanizam smanjenja enzimске aktivnosti u uvjetima oksidacijskog stresa (Zaffagnini i sur. 2013).

#### **4 MOONLIGHTING FUNKCIJE ANIMALNE GAPDH**

Animalna GAPDH je primarno lokalizirana u citoplazmi gdje ima ulogu u glikolizi. Različite redoks posttranslacijske promjene inhibiraju njenu enzimsku aktivnost te mogu inducirati i regulirati *moonlighting* funkcije. Animalna GAPDH je, osim u citoplazmi, pronađena i u jezgri. Ima ulogu u regulaciji stabilnosti mRNA, metabolizmu hema, održavanju genetičkog integriteta i katalizira fuziju membrana (Sirover 2014). Dvije najbolje istražene *moonlighting* funkcije animalne GAPDH su aktiviranje apoptoze i posttranskripcijska regulacija endotelina.

##### **4.1 Uloga animalne GAPDH u apoptozi**

Animalna GAPDH sudjeluje u signalnoj kaskadi koja dovodi do apoptoze. Za aktivaciju signalnog puta NO mora S-nitrozilirati Cys u aktivnom mjestu GAPDH. NO se sintetizira u animalnim stanicama kada stanica primi signal za apoptozu. Nakon S-nitrozilacije GAPDH se veže na Siah1, E3-ubikvitin ligazu koja ima nuklearni lokalizacijski signal. Cijeli proteinski kompleks (GAPDH/Siah1) se premjesti u jezgru i aktivira proteine koji su odgovorni za apoptozu (Zaffagnini i sur. 2013).

Interakcija GAPDH i Siah1 je negativno regulirana na mnogo načina kako bi se spriječila apoptoza u uvjetima blagog oksidacijskog stresa, dok je još moguće popraviti oštećenja u stanici. Protein GOSPEL je smješten u citoplazmi. Nakon S-nitrozilacije GOSPEL-a on na sebe veže GAPDH i tako onemogućava vezanje GAPDH na Siah1. Isti učinak ima i prisutnost supstrata G3P. On se veže u katalitičko mjesto GAPDH i time sprječava S-nitrozilaciju enzima. U uvjetima oksidacijskog stesa GAPDH formira proteinske agregate koji su stabilizirani disulfidnim mostovima između katalitičkih Cys. Takvi agregati pokreću signal za apoptozu, ali je taj signal neovisan o nuklearnoj lokalizaciji enzima Siah1. Nakon premještanja iz citoplazme u jezgru, proteinski kompleks GAPDH/Siah1 može stupiti u interakciju sa proteinom B23 te dolazi do transnitrozilacije. Kompleks NO i GAPDH se veže na protein B23. GAPDH se otpušta iz proteinskog kompleksa, a protein B23 ostaje vezan na Siah1 i blokira njegovu aktivnost (Zaffagnini i sur. 2013).

## **4.2 Posttranskripcijska regulacija ekspresije gena posredovana animalnom GAPDH**

GAPDH se može vezati na mRNA i time povećava njenu stabilnost ili uzrokuje degradaciju, ovisno o tome koji protein kodira mRNA. Posttranslacijske redoks modifikacije GAPDH reguliraju njeno vezanje na mRNA ljudskog endotelina (ET-1). GAPDH veže 3' netranslatiranu regiju (UTR) mRNA u svoju domenu za vezanje kofaktora  $\text{NAD}^+$ . Time potiče odmatanje sekundarne strukture mRNA ET-1 i njenu degradaciju. Nakon tretmana GAPDH sa GSSG i GSNO, koji uzrokuju glutationilaciju i S-nitrozilaciju enzima, nije došlo do vezanja mRNA na GAPDH. Na osnovu toga je zaključeno da oksidacijski stres, koji također uzrokuje posttranslacijske modifikacije GAPDH (uključujući glutationilaciju i S-nitrozilaciju), utječe na posttranskripcijsku regulaciju ET-1 (Zaffagnini i sur. 2013).

## **5 METABOLIČKE I *MOONLIGHTING* FUNKCIJE BILJNE CITOPLAZMATSKJE GAPDH**

Za razliku od životinja koje imaju samo jedan gen za GAPDH, biljke imaju nekoliko različitih gena koji kodiraju za izoenzime GAPDH. Biljke u citoplazmi imaju dva izoenzima GAPDH čija je aminokiselinske sekvenca 98% slična. Osim fosforilirajuće GAPDH, imaju i nefosforilirajuću GAPDH (GAPN) koja oksidira G3P direktno u BPGA i time se može zaobići reakcija katalizirana s GAPDH (Zaffagnini i sur. 2013).

### **5.1 Metaboličke funkcije**

Kao što je već prije spomenuto GAPDH ima ulogu u glikolizi. Smanjenje količine citoplazmatske GAPDH nema nekog većeg utjecaja na fenotip biljke budući da postoje i drugi izoenzimi i GAPN koja može katalizirati istu reakciju. Mutanti biljke *Arabidopsis thaliana*, kojima su inaktivirani geni za citoplazmatsku GAPDH, pokazivali su reducirani rast i smanjenu fertilnost te aberacije sjemenki i plodova. Ove promjene su povezane sa smanjenom stopom respiracije što pokazuje da je nastali fenotip posljedica metaboličkih promjena (Zaffagnini i sur. 2013).

### **5.2 Moonlighting funkcije**

Dokazano je da biljna citoplazmatska GAPDH stupa u interakciju sa mnogim proteinima, da je podložna posttranslacijskim promjenama te da može promijeniti položaj u stanici. Iz tih

istraživanja možemo zaključiti da biljna citoplazmatska GAPDH ima *moonlighting* funkcije, ali njihova uloga još uvijek nije u potpunosti poznata.

### 5.2.1 Prijenos signala posredovan biljnom citoplazmatskom GAPDH

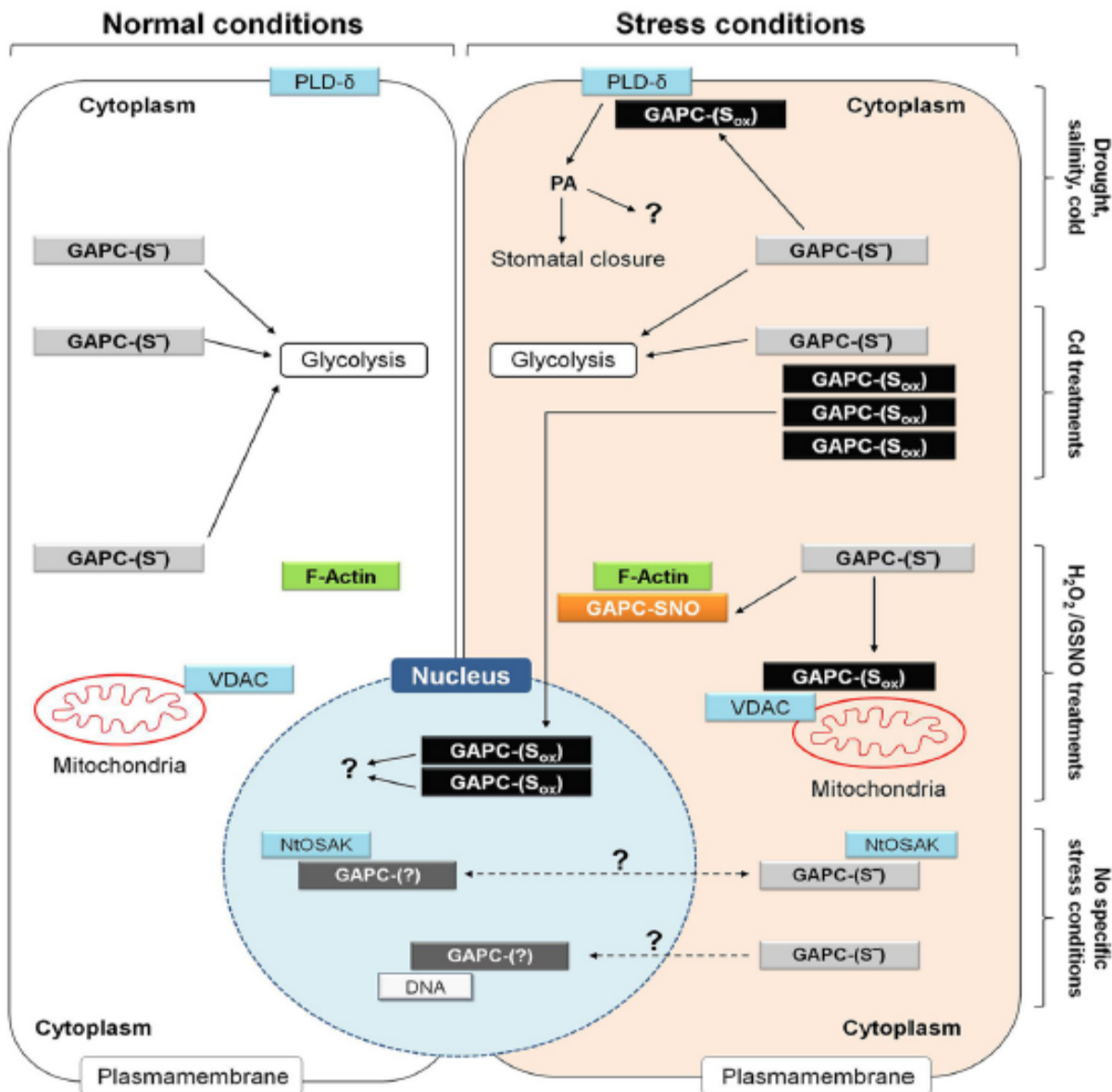
Fosfolipaza D $\delta$  (PLD $\delta$ ) iz biljaka roda *Arabidopsis* je protein vezan na staničnu membranu i sudjeluje u prijenosu staničnog signala nakon izlaganja biljke H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. PLD $\delta$  regulira odgovor biljke na oksidacijski stres. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ne aktivira direktno PLD $\delta$ , već je za aktivaciju PLD $\delta$  potrebna interakcija s GAPDH. Nakon izlaganja biljke H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, dolazi do oksidacije katalitičkog Cys i inhibicije enzimске aktivnosti GAPDH. Time se potiče stvaranje proteinskog kompleksa GAPDH-PLD $\delta$  i dolazi do aktivacije PLD $\delta$  (Slika 3.). Uočeno je pojačano stvaranje proteinskog kompleksa GAPDH-PLD $\delta$  u uvjetima oksidacijskog stresa. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stabilizira interakcije između ova dva enzima. Ovaj signalni put ima ulogu u stomatalnoj regulaciji posredovanoj biljnim hormonom abscizinskom kiselinom (ABA) i inhibiciji rasta (Guo i sur. 2012). Nakon aktivacije PLD $\delta$  dolazi do otpuštanja fosfatidne kiseline (PA) koja se veže na GAPDH i potiče proteolitičko cijepanje enzima. Vezanje PA na GAPDH se povećava u uvjetima oksidacijskog stresa, ali uočen je potpun nedostatak vezanja PA kada se poveća koncentracija Zn<sup>2+</sup>. Kationi Zn<sup>2+</sup> inhibiraju enzimsku aktivnost GAPDH. Nakon vezanja PA nije došlo do promjene položaja citoplazmatske GAPDH. Proteolitičko cijepanje GAPDH je uočeno u uvjetima *in vivo*. U uvjetima *in vitro* nisu dobiveni isti rezultati, što upućuje na to da u stanici, osim PA, postoje i drugi faktori koji su neophodni za proteolitičko cijepanje GAPDH (Kim i sur. 2013). Ne zna se koja je točno uloga proteolitičke razgradnje GAPDH. Jedno istraživanje je pokazalo da je to zapravo mehanizam negativne povratne sprege kojim se regulira aktivacija PLD $\delta$  posredovana s GAPDH (Guo i sur. 2012). Novija istraživanja su pokazala da je dio peptida nastao proteolitičkim cijepanjem GAPDH smješten u jezgri pa se smatra da imaju ulogu u ekspresiji gena (Kim i sur. 2013).

Protein NtOSAK je protein kinaza iz biljke *Nicotiana tabacum*, a aktivira se u uvjetima osmotskog stresa i sudjeluje u prijenosu signala u stanici. U uvjetima osmotskog stresa nastaje NO koji je bitan za aktivaciju NtOSAK, ali ne dolazi do S-nitrozilacije nego do fosforilacije protein kinaze. NO uzrokuje S-nitrozilaciju GAPDH. Utvrđena je korelacija između S-nitrozilacije GAPDH i aktivacije NtOSAK protein kinaze te je dokazano da ovi proteini tvore komplekse. Za nastanak proteinskog kompleksa nije nužno potrebna S-nitrozilacija GAPDH.

Nastali kompleks je uglavnom smješten u citoplazmi, dok se mali dio nalazi i u jezgri (Slika 3.). Nije otkriveno koja je uloga interakcije između GAPDH i NtOSAK. Vezanje GAPDH nije imalo utjecaj na enzimsku aktivnost NtOSAK. Činjenica da GAPDH stvara kompleks sa protein kinazom upućuje na moguću ulogu GAPDH u prijenosu signala u stanici (Waver i sur. 2010).

### **5.2.2 Lokalizacija biljne citoplazmatske GAPDH u jezgri**

Nakon tretmana korijena biljke *Arabidopsis thaliana* kadmijem dolazi do translokacije citoplazmatske GAPDH u jezgru (Slika 3.). Dokazana je korelacija između akumulacije NO, oksidacije GSH i translokacije GAPDH u jezgru. Inhibicija biosinteze GSH i inaktivacija katalaze dovodi do istog učinka. Ovi rezultati upućuju na to da translokaciju GAPDH u jezgru uzrokuju oksidirajući uvjeti u citoplazmi, a ne sam kadmij. Oksidirajući uvjeti stimuliraju transkripciju citoplazmatske GAPDH te inaktivaciju enzimске aktivnosti i premještanje enzima u jezgru (Vescovi i sur. 2013). Nije otkriveno koji je signal potreban za translokaciju. Pretpostavljalo se da je potrebna S-nitrozilacija (kao kod animalne GAPDH), ali kasnije je dokazano da translokacija ne ovisi o posttranslacijskoj redoks modifikaciji katalitičkog Cys. Smještaj citoplazmatske GAPDH u jezgri upućuje na to da enzim ima *moonlighting* funkcije, ali se još ne zna koja je njegova uloga. Pretpostavlja se da ima ulogu u zaštiti molekule DNA od oksidacijskih oštećenja. Citoplazmatska GAPDH se veže na sekvencu DNA koja kodira za NADP-malat dehidrogenazu, ali se ne zna koja je posljedica ove interakcije (Zaffagnini i sur. 2013).



**Slika 3.:** Metaboličke i *moonlighting* funkcije biljne citoplazmatske GAPDH. U normalnim uvjetima u stanici GAPDH sudjeluje u procesu glikolize. Smještena je u citoplazmi i nema posttranslacijske redoks modifikacije u aktivnom mjestu. Tijekom stresnih uvjeta dolazi do posttranslacijskih redoks modifikacija katalitičkog Cys. Inhibira se enzimska aktivnost, ali GAPDH aktivira fosfolipazu Dδ (PLDδ), i NtOSAK, utječe na polimerizaciju F-aktina i veže se na membranu mitohondrija preko naponom reguliranih anionskih kanala (*voltage-dependent anion channels*, VDAC). Citoplazmatska GAPDH se može premjestiti u jezgu i vezati na molekulu DNA, ali nije poznata funkcija tih interakcija. (preuzeto iz Zaffagnini i sur. 2013)

### **5.2.3 Vezanje biljne citoplazmatske GAPDH na membranu mitohondrija i na citoskelet**

Mnogi glikolitički enzimi, uključujući i GAPDH, se vežu na vanjsku membranu mitohondrija. Vezanje na mitohondrij se uglavnom odvija u uvjetima koji zahtijevaju povećanu stopu respiracije. Time se piruvat, krajnji produkte glikolize, direktno transportira u mitohondrij (Giegé i sur. 2003). Vezanje biljne citoplazmatske GAPDH na mitohondrij se povećava nakon izlaganja  $H_2O_2$ , tj. kada je inaktivirana enzimska aktivnost GAPDH. Zato se smatra da vezanje GAPDH na mitohondrij ima neku alternativnu funkciju. GAPDH se veže preko naponom reguliranih anionskih kanala (VDAC) u vanjskoj membrani mitohondrija (Slika 3). U animalnim stanicama vezanje GAPDH na VDAC je signal za apoptozu. Još nije istraženo da li se isto događa i u biljnim stanicama (Zaffagnini i sur. 2013).

Biljna citoplazmatska GAPDH stupa u interakciju sa citoskeletom i potiče polimerizaciju aktina (Slika 3). I ova funkcija GAPDH je povezana sa oksidirajućim uvjetima u stanici i posttranslacijskim redoks modifikacijama. Nakon izlaganja biljke GNSO dolazi do glutationilacije i S-nitrozilacije GAPDH što stimulira vezanje enzima na F-aktin (Zaffagnini i sur. 2013).

### **5.2.4 Uloga citoplazmatske GAPDH u imunološkom odgovoru biljke**

Tijekom imunološkog odgovora biljke povećava se produkcija kisikovih radikala i unos  $Ca^{2+}$  te dolazi do aktivacije signalnog puta posredovanog MAP kinazama i brojnih transkripcijskih promjena. Citoplazmatska GAPDH je negativan regulator imunološkog odgovora biljke i bitna je za preciznu regulaciju duljine i jačine imunološkog odgovora. Sprječava hipersenzitivan imunološki odgovor i apoptozu koju uzrokuje prekomjerna količina kisikovih radikala. Tijekom imunološkog odgovora povećava se aktivnost GAPDH. Piruvat, krajnji produkt glikolize, veže na sebe kisikove radikale i tako štiti stanicu. Glikolizom se također dobiva energija (ATP) koja je neophodna za transkripciju. Tijekom imunološkog odgovora dolazi do promjene položaja GAPDH u stanici. Osim u citoplazmi, GAPDH je detektirana u jezgri te je utvrđeno da se veže na staničnu membranu i na membranu endoplazmatskog retikuluma (Henry i sur. 2015). Ne zna se koja je funkcija promjene položaja. Pretpostavlja se da tijekom imunološkog odgovora GAPDH stupa u interakciju sa membranskim proteinom PLD $\delta$  budući da je stvaranje proteinskog kompleksa GAPDH-PLD $\delta$  već dokazano.

Citoplazmatska GAPDH negativno regulira akumulaciju virusnih čestica mozaičnog virusa bambusa (BaMV) i njegove pripadajuće satelitske RNA (satBaMV). Genom BaMV se sastoji od jednolančane (+)RNA. Citoplazmatska GAPDH se veže na poliA rep koji je dio 3' UTR genoma BaMV i satBaMV. To onemogućava vezanje RNA-ovisne-RNA-polimeraze (RdRp) te se tako negativno regulira replikacija i transkripcija BaMV i satBaMV. Smanjenjem ekspresije citoplazmatske GAPDH se povećava akumulacija BaMV i satBaMV. Virusna RNA se veže u domenu za vezanje kofaktora enzima GAPDH (slično kao mRNA kod animalne GAPDH). Povećanjem koncentracije  $\text{NAD}^+$  se inhibira vezanje virusne RNA na citoplazmatsku GAPDH (Prasanth i sur. 2011). Kada biljku *Nicotiana benthamiana* inficiramo virusom TBS (*Tomato Bush Stunt*), citoplazmatska GAPDH uzrokuje potpuno drugačiji učinak. Citoplazmatska GAPDH postane dio kompleksa virusne replikaze. Veže se na 3' UTR i pomaže vezanju virusne RdRp na (-)RNA virusnog genoma (Zaffagnini i sur. 2013). Tako se potakne replikacija virusa TBS. Regulacija replikacije virusa pomoću citoplazmatske GAPDH nije detaljno proučena, ali smatra se da posttranslacijske redoks modifikacije citoplazmatske GAPDH imaju ulogu u vezanju enzima na virusnu RNA.

## 6 ZAKLJUČAK

Ekspresija biljne citoplazmatske GAPDH je neophodna za normalno funkcioniranje biljne stanice. Osim uloge u glikolizi, biljna citoplazmatska GAPDH ima mnogobrojne *moonlighting* funkcije. *Moonlighting* funkcije su posljedica reakcijskog mehanizma enzima, koji se temelji na katalitičkom Cys, te redoks posttranslacijskih modifikacija. Redoks posttranslacijske modifikacije su odgovorne za aktiviranje i regulaciju nekih *moonlighting* funkcija. Zbog kompleksne povezanosti između redoks uvjeta u stanici i enzimske aktivnosti biljne citoplazmatske GAPDH smatra se da ona služi kao senzor oksidacijskog stresa. Do sada je otkriveno da biljna citoplazmatska GAPDH mijenja svoj položaj unutar stanice, veže se na membrane organela i na staničnu membranu te stupa u interakciju sa mnogim proteinima i sa citoskeletom. Može aktivirati proteine koji sudjeluju u prijenosu signala u stanici. Otkrivena je i njena uloga u imunološkom odgovoru biljke. Vezanjem biljne citoplazmatske GAPDH na virusnu RNA može doći do inhibicije ili aktivacije replikacije virusa. Pretpostavlja se biljna citoplazmatska GAPDH ima ulogu u ekspresiji gena i u zaštiti molekule DNA od oksidacijskih oštećenja budući da je dokazano da se veže na DNA. Ako usporedimo biljnu citoplazmatsku GAPDH sa animalnom GAPDH, čije su *moonlighting* funkcije dobro poznate, vidimo da oba enzima imaju slična svojstva što upućuje na to da i biljna citoplazmatska GAPDH može imati slične *moonlighting* funkcije. Do sada je razjašnjen samo mali dio *moonlighting* funkcija biljne citoplazmatske GAPDH. Potrebna su dodatna istraživanja kako bi se otkrile točne uloge svih navedenih *moonlighting* funkcija. Poznavanje tih uloga bi nam omogućilo uvid u kompleksnu povezanost između biljnog metabolizma i regulacije oksidacijskog stresa.



## 7 LITERATURA

- Mariette Bedhomme, Mattia Adamo, Christophe H. Marchand, Jeremy Couturier, Nicolas Rouhier, Stephane D. Lemaire, Mirko Zaffagnini and Paolo Trost: **Glutathionylation of cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from the model plant *Arabidopsis thaliana* is reversed by both glutaredoxins and thioredoxins *in vitro***, Biochemical Journal, 445: 337–347 (2012)
- Philippe Giegé, Joshua L. Heazlewood, Ute Roessner-Tunali, Harvey Millar, Alisdair R. Fernie, Christopher J. Leaver and Lee J. Sweetlove: **Enzymes of glycolysis are functionally associated with the mitochondrion in *Arabidopsis* cells**, The Plant Cell, 15: 2140–2151 (2003)
- Liang Guo, Shivakumar P. Devaiah, Rama Narasimhan, Xiangqing Pan, Yanyan Zhang, Wenhua Zhang and Xuemin Wanga: **Cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases interact with phospholipase D $\delta$  to transduce hydrogen peroxide signals in the *Arabidopsis* response to stress**, The Plant Cell, 24: 2200–2212 (2012)
- Elizabeth Henry, Nicholas Fung, Jun Liu, Georgia Drakakaki and Gitta Coaker: **Beyond glycolysis: GAPDHs are multifunctional enzymes involved in regulation of ROS, autophagy, and plant immune responses**, PLOS Genetics (2015)
- Sang-Chul Kim, Liang Guo and Xuemin Wang: **Phosphatidic acid binds to cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and promotes its cleavage in *Arabidopsis***, The Journal of Biological Chemistry, 288(17): 11834–11844 (2013)
- Kambham Reddisiva Prasanth, Ying-Wen Huang, Ming-Ru Liou, Robert Yung-Liang Wang, Chung-Chi Hu, Ching-Hsiu Tsai, Menghsiao Meng, Na-Sheng Lin and Yau-Heiu Hsu: **Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase negatively regulates the replication of *Bamboo Mosaic Virus* and its associated satellite RNA**, Journal of Virology, 85: 8829–8840 (2011)
- Trivikrama S. Rao and Michael G. Rossmann: **Comparison of super-secondary structures in proteins**, Journal of Molecular Biology, 76: 251–250–256 (1973)

- Michael A. Sirover: **Structural analysis of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase functional diversity**, The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 0: 20–26 (2014)
- Marco Vescovi, Mirko Zaffagnini, Margherita Festa, Paolo Trost, Fiorella Lo Schiavo and Alex Costa: **Nuclear accumulation of cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in cadmium-stressed Arabidopsis roots**, Plant Physiology, 162: 333–346 (2013)
- Izabela Wawer, Maria Bucholc, Jeremy Astier, Anna Anielska-Mazur, Jennifer Dahan, Anna Kulik, Aleksandra Wyśłouch-Cieszyńska, Monika Zareba-Kozioł, Ewa Krzywinska, Michal Dadlez, Grazyna Dobrowolska and David Wendehenne: **Regulation of *Nicotiana tabacum* osmotic stress-activated protein kinase and its cellular partner GAPDH by nitric oxide in response to salinity**, Biochemical Journal, 429: 73–83 (2010)
- Mirko Zaffagnini, Simona Fermani, Alex Costa, Stéphane D. Lemaire and Paolo Trost: **Plant cytoplasmic GAPDH: redox posttranslational modifications and moonlighting properties**, Frontiers in Plant Science, 4: 450 (2013)

## 8 SAŽETAK

Biljna citoplazmatska gliceraldehid-3-fosfat-dehidrogenaza (GAPDH) je glikolitički enzim ovisan o kofaktoru  $\text{NAD}^+$ . Za njenu enzimsku aktivnost je neophodan katalitički Cys-154. Osim uloge u glikolizi biljna citoplazmatska GAPDH obavlja i dodatne, *moonlighting* funkcije. *Moonlighting* funkcije su kontrolirane redoks posttranslacijskim modifikacijama katalitičkog Cys čime se inhibira enzimsku aktivnost GAPDH. Katalitički Cys se u fiziološkim uvjetima nalazi u deprotoniranom obliku, zato je jaki nukleofil i podložan je redoks modifikacijama. Najčešće redoks modifikacije su S-nitrozilacija, glutationilacija i oksidacija. Redoks modifikacije mogu biti reverzibilne i ireverzibilne, a za *moonlighting* funkcije biljne citoplazmatske GAPDH su bitne reverzibilne modifikacije. Oksidacijski uvjeti uzrokuju promjenu položaja citoplazmatske GAPDH u stanici. Citoplazmatska GAPDH se premjesti u jezgru, veže se na membranu mitohondrija, staničnu membranu i na elemente citoskeleta. Također stupa u interakciju sa drugim proteinima i tvori proteinske komplekse. Za razliku od *moonlighting* funkcija animalne GAPDH, *moonlighting* funkcije biljne citoplazmatske GAPDH još uvijek nisu dovoljno istražene. Cilj ovog rada je dati pregled dosadašnjih istraživanja koja daju uvid u regulaciju i posljedice *moonlighting* funkcija biljne citoplazmatske GAPDH.

## 9 SUMMARY

Plant cytoplasmic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) is enzyme involved in glycolysis that uses  $\text{NAD}^+$  as a cofactor. The most important catalytic residue is Cys-154. Apart from its role in glycolysis, plant cytoplasmic GAPDH has additional, moonlighting functions. Moonlighting functions are regulated by post-translational redox modifications of catalytic Cys residue which inhibits GAPDH enzymatic activity. In physiological conditions the thiol group of the catalytic Cys is deprotonated which makes it strong nucleophile that can undergo redox modifications. The most common redox modifications are S-nitrosylation, glutathionylation and oxidation. There are two types of redox modifications: reversible and irreversible. Moonlighting functions of plant cytoplasmic GAPDH are triggered by reversible redox modifications. Oxidizing conditions in plant cell cause changes in subcellular localization. Cytoplasmic GAPDH can translocate into nucleus, associate with outer membrane of mitochondria, plasma membrane or cytoskeleton. Cytoplasmic GAPDH can also associate with other proteins and form protein complexes. In contrast with the well established moonlighting functions of animal GAPDH, little is known about moonlighting properties of plant cytoplasmic GAPDH. The aim of this review is to summarize previous research and provide an insight into regulation of moonlighting properties of plant cytoplasmic GAPDH.